

基于气相色谱-四极杆飞行时间质谱的 鲸类不同组织样品中脂肪酸提取方法研究

邹雅倩¹, 翟玉欢², 李松海², 李平静¹

(1. 中国科学院深海科学与工程研究所, 分析测试中心, 海南 三亚 572000;

2. 中国科学院深海科学与工程研究所, 海洋哺乳动物与海洋生物声学研究室, 海南 三亚 572000)

摘要: 研究鲸类各器官组织中的脂肪酸组成及含量是揭示污染物(如重金属、持久性有机污染物)对其毒理效应的重要途径。然而, 目前缺乏针对海洋鲸类动物多种组织的高效、环保且普适性强的脂肪酸提取方法。本研究基于气相色谱-四极杆飞行时间质谱(GC-Q-TOF MS)技术, 开发了一种适用于鲸类多器官组织的绿色、普适性的脂肪酸提取与分析方法。通过系统比较氯仿/甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)/甲醇、正己烷/异丙醇 3 种二元提取剂, 以及 MTBE/氯仿/甲醇三元提取剂的提取效果, 发现 MTBE/甲醇(5:1, V/V)体系不仅提取效率高, 涵盖的脂肪酸种类最多, 而且显著降低了传统氯仿提取方法的环境污染风险和操作人员毒性暴露风险, 具有绿色环保特性, 可作为最佳提取溶剂。本研究进一步优化了衍生试剂浓度, 并比较了瓜头鲸的肝脏、肺、脾、肾、肌肉间的脂肪酸组成差异。结果表明, 衍生试剂浓度变化对提取结果影响较小; 而不同组织因其独特的代谢途径、生理功能及脂质含量, 其脂肪酸组成存在显著差异。本研究可为深入理解鲸类脂质代谢及环境污染物的影响奠定方法学基础。

关键词: 气相色谱-四极杆飞行时间质谱(GC-Q-TOF MS); 鲸类; 脂肪酸提取; 甲基叔丁基醚/甲醇

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2026)01-0110-11

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0052 CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0052

Study on Extraction Methods of Fatty Acids from Different Tissues of Cetaceans Based on GC-Q-TOF MS

ZOU Ya-qian¹, ZHAI Yu-huan², LI Song-hai², LI Ping-jing¹

(1. Analytical Instrumentation Center, Institute of Deep-sea Science and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572000, China; 2. Marine Mammal and Marine Bioacoustics Laboratory, Institute of Deep-sea Science and Engineering, Chinese Academy of Sciences, Sanya 572000, China)

Abstract: Analyzing fatty acid profiles in cetacean organs is crucial for evaluating the toxicological impacts of pollutants (e.g., heavy metals, persistent organic pollutants), yet a standardized, eco-friendly, and universally applicable method for fatty acid extraction from multiple tissues of marine cetaceans remains lacking. Lipids play essential roles in metabolism and cellular structure, serving as components of cell membranes, mediators of cell signaling, and energy storage molecules, which are indispensable for all organisms. Traditional approaches relying on chloroform/methanol systems have posed significant risks of environmental contamination and toxicity to operators, while their

applicability across diverse tissues (e.g., liver, lung, spleen, kidney, muscle) remains unverified. This study aims to develop a green and universal fatty acid extraction approach coupled with gas chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (GC-Q-TOF MS) for analyzing fatty acids from multi-organ tissues (liver, lung, spleen, kidney, muscle) of cetaceans, thereby providing a reliable technical solution for fatty acid detection in stranded marine cetaceans. The research systematically compared extraction efficiencies of fatty acids with different organic solvent systems, including binary mixtures (chloroform/methanol, methyl tert-butyl ether (MTBE)/methanol, *n*-hexane/isopropanol) and a ternary mixture (MTBE/chloroform/methanol). The results demonstrated that the MTBE/methanol (5:1, *V/V*) system exhibited superior performance over the others, extracting the highest diversity of fatty acids while reducing environmental pollution risks and toxicity to operators compared to traditional chloroform-based methods. Under optimal extraction conditions, the concentration of derivatization reagents was also optimized. Notably, changes in reagent concentration showed minimal impact on extraction efficiency. Subsequent analysis revealed significant variations in fatty acid compositions among the five organs (liver, lung, spleen, kidney, muscle) of melon-headed whales (*Peponocephala electra*), which were attributed to distinct metabolic pathways, physiological functions, and lipid contents. For instance, the liver contains up to 60.09% of unsaturated fatty acids, such as arachidonic acid (C20:4 ω -6) and DHA (C22:6 ω -3), which may be related to its important detoxification function; the lungs have a saturated fatty acid content of 72.82%, as a large amount of straight-chain saturated fatty acids enhances their mechanical stability; the spleen and kidneys have very similar fatty acid profiles due to overlapping physiological functions; muscles are rich in 50.11% saturated fatty acids, such as palmitic acid (C16:0), which are used for energy storage. This study fills the technical gap in the analysis of fatty acids in cetacean multi-tissues, providing the first systematic characterization of fatty acid profiles in five key organs. The established green extraction method not only enables detailed investigations in lipid metabolism, but also paves the way for assessing pollutant bioaccumulation in marine cetaceans. Future research may extend this approach to other cetacean species or conduct long-term monitoring of the impacts of environmental contaminants, enhancing our understanding of the ecological health of marine mammals.

Key words: gas chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (GC-Q-TOF MS); cetaceans; fatty acid extraction; methyl tert-butyl ether/methanol

近年来,随着化工产业飞速发展,渔船捕捞、海上工程等人类活动造成的水质污染已严重威胁海洋生态环境。从污染物暴露研究方法的纵向演进来看,生物标志物分析技术经历了从单一金属检测到多组学整合分析的转变^[1-2]。海洋鲸类作为生态系统的保护伞物种,集生态、科研和文化价值于一体,其体内累积的污染物可通过食物链传递并加剧毒性效应^[3-5]。然而,相较于陆地哺乳动物,针对鲸类的生理学研究仍存在空白。脂质在生物体的新陈代谢和细胞结构中具有重要作用,如组成细胞膜结构、传递细胞信号和储存能量,是所有生物体必不可少的物质^[6]。

近年来,脂肪酸被提出是一种污染物暴露的生物标志物,污染物(如微量元素)会通过干扰代谢途径诱导细胞和组织损伤,改变细胞膜的结构和物理化学性质,也可通过产生活性氧引起脂质过氧化^[7-8]。这些变化可通过脂肪酸谱来反映,尤其是参与重要生理过程且具有营养价值的不饱和脂肪酸(ω -3PUFA、 ω -6PUFA)。由于生物体无法自主合成所有的必需脂肪酸,必须通过捕食获得,因此脂肪酸谱的变化可用于揭示污染物对水生食物链中生物的影响^[9-13]。之前关于脂肪酸的研究对象大多是鱼类、藻类、贝类,主要探讨其营养、医药价值等功能性脂质,其中包括脂肪

酸^[14-17]。由于以鲸类为代表的哺乳动物组织间存在明显的异质性,如基质组成、污染物负载水平、脂质谱特征等^[18-19],适用于海洋鲸类组织样本的脂肪酸提取方法尚未成熟。肝脏是“解毒”的重要组织,也是糖、脂类、蛋白质、维生素、激素等物质的代谢中心,存在大量脂蛋白复合物,需使用强极性溶剂解离。肾脏是“排毒”组织,负责过滤血液中杂质、维持体液和电解质平衡,因此也是最易受到污染物影响的组织,其富含电解质(如 Na^+ 、 K^+),易与溶剂发生离子干扰。另外,微塑料引起的炎症和机械损伤的长期积累,以及污染导致的海水富营养化均会影响海洋哺乳动物的肺部功能,高水分的肺部组织会导致溶剂渗透效率偏低。脾脏是重要的淋巴器官,参与免疫调节,间接影响脂质代谢,毒素积累、免疫抑制和氧化应激等外源污染造成的刺激都会影响海洋哺乳动物的脾功能,其中易形成致密基质的多糖-蛋白复合物会阻碍溶剂扩散。肌肉组织可分泌多种肌肉因子(如肌动蛋白、IL-6),并参与调节代谢、炎症和免疫反应,其脂肪酸含量能够反映海洋生态的健康情况,但肌纤维蛋白胶体会显著降低溶剂的接触面积。目前缺乏针对鲸类动物组织样本的兼具强解离性、高渗透性、抗干扰性的通用提取流程,这制约了对环境污染物生态毒理效应的多维度评估,及其跨器官机制的解析。

脂质的净化提取是脂肪酸组成分析流程中的重要步骤,其核心在于通过溶剂体系破坏生物基质屏障,并选择性溶解目标脂质分子^[20]。为了高效地从生物组织中提取脂质,需采用极性与非极性的混合溶剂,前者用于解离细胞膜磷脂双分子层并裂解脂质-蛋白复合物,后者负责溶解中性脂质(甘油三酯、胆固醇酯等),二者协同作用可实现全谱系脂质的释放^[21-22]。传统的脂质提取方法有 Folch 法^[23]、Bligh-Dyer 法^[24],但由于氯仿具有强致癌性和毒性,正己烷/异丙醇^[25]、甲基叔丁基醚(MTBE)/甲醇^[26]、丁醇/甲醇^[27]、正丙醇/正己烷^[28]等低毒性混合溶剂被相继提出,并通过实验验证了其于氯仿/甲醇溶剂具有相似的提取效果。然而,针对海洋鲸类,特别是多种器官组织(如肝、肺、脾、肾、肌肉)的脂肪酸提取,目前尚缺乏高效、环境友好且具有广泛适用性的标准化前处理方法。传统方法常依赖氯仿等有毒

溶剂,存在环境污染和健康风险。本研究旨在开发一种适用于鲸类多种器官组织的绿色、普适性的脂肪酸提取方法。

为此,本研究借助气相色谱-四极杆飞行时间质谱(GC-Q-TOF MS)定性分析技术,系统对比多种溶剂体系(包括氯仿/甲醇、MTBE/甲醇、正己烷/异丙醇二元提取剂,以及 MTBE/氯仿/甲醇三元提取剂)的提取效率与环保特性。在最优提取条件下,深入探讨衍生试剂浓度对不同组织提取效果的影响,并比较瓜头鲸 5 种关键器官组织(肝脏、肺、脾、肾、肌肉)在相同提取条件下的脂肪酸组成差异。希望为理解鲸类不同组织的脂质代谢特征及环境胁迫响应差异提供新的视角。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

气相色谱-四极杆飞行时间质谱联用仪、HP-5ms 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm): 美国 Agilent 公司产品; 万分之一天平: 瑞士 Mettler 公司产品; 超纯水仪: 美国 Merck 公司产品; 涡旋仪: 德国 IKA 公司产品; 高速冷冻离心机: 德国 Eppendorf 公司产品; 平行浓缩仪: 北京 LabTech 公司产品; 恒温水浴锅、超声清洗机: 宁波新芝公司产品。

1.2 主要材料与试剂

瓜头鲸组织样品(肝脏、肺、脾、肾、肌肉): 2021 年 7 月采样于浙江省台州市临海市头门港海域北洋坝滩涂,经真空冷冻干燥处理 48 h 后,均质研磨成粉末样品。

甲醇(色谱级,纯度 $\geq 99.9\%$)、正己烷(色谱级,纯度 $\geq 99\%$)、异丙醇(色谱级,纯度 $\geq 99.9\%$): 上海麦克林公司产品; 氯仿(分析纯): 广州化学试剂厂产品; 甲基叔丁基醚(色谱级,纯度 $\geq 99.5\%$): 山东西亚公司产品; 三氟化硼-甲醇溶液: 上海阿拉丁公司产品; C4~C24 脂肪酸甲酯混标(纯度 $\geq 99\%$): 美国 Nu-Chek 公司产品,具体浓度信息列于附表 1; 超纯水: 由德国 Merck 公司的超纯水仪制备。

1.3 实验条件

1.3.1 脂质提取 称取 50~60 mg 瓜头鲸肝脏冻干样品于 2 mL EP 管中,按体积比向样品中加入提取剂: 氯仿/甲醇(1:1、2:1、3:1),正己烷/异

丙醇(3:2、3:1、2:1、1:1), MTBE/甲醇(9:1、5:1、4:1、3:1、2:1、1:1、1:5、1:9), MTBE/氯仿/甲醇(5:0.5:1、5:1:1、5:1.25:1、5:1.5:1、5:2:1、5:1:2、5:3:4(1)、5:3:4(2)、5:12:13、1:6:6、1:4:4、1:2:2)(注: 5:3:4(1)、5:3:4(2) 2个样品的前处理提取剂比例相同, 但提取剂总体积分别为 960 μL 和 480 μL)。随后加入 200 μL 超纯水和 60 μL 1 000 mg/L C19:0 脂肪酸甲酯内标, 涡旋 30 s 混匀, 低温超声提取 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 15 min, 静置分层, 吸取氯仿相(下层)、正己烷相(下层)、MTBE 相(上层)至 15 mL 离心管中, 氮吹干燥有机溶剂, 得到脂质, 称重。

1.3.2 脂肪酸的衍生 向干燥脂质中加入 2 mL 质量浓度为 14% 的三氟化硼-甲醇溶液, 置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中甲酯化反应 30 min, 反应结束后冷却至室温; 再加入 1 mL 超纯水和 2 mL 正己烷, 涡旋混匀, 静置分层, 取上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 装入 2 mL GC 样品瓶中, 待测。

1.4 GC-Q-TOF MS 分析

1.4.1 色谱条件 Agilent HP-5ms 石英毛细管柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm); 升温程序: 40 $^{\circ}\text{C}$ 保持 2 min, 以 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 175 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 以 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 186 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min, 以 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 270 $^{\circ}\text{C}$, 保持 10 min; 载气(He)流速 1.2 mL/min; 进样量 1 μL ; 分流比 200:1。

1.4.2 质谱条件 电子电离(EI)源, 电子能量 70 eV, 传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 离子源温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 质量扫描范围 m/z 50~450。

1.4.3 C4~C24 脂肪酸甲酯标样测试 对标准样品中的脂肪酸甲酯组分进行检测, 并结合 NIST20 谱库逐一定性分析。

1.4.4 样品测试及数据处理 采用与标准样品相同的采集方法, 对经不同溶剂体系前处理的样品进行检测, 通过与脂肪酸甲酯标准品谱图及保留时间对比, 对样品中的脂肪酸甲酯进行定性分析。采用内标法(添加 C19:0 作为内标)对目标脂肪酸甲酯进行相对定量分析, 以校正样品前处理(如萃取、衍生化、浓缩等)和进样过程中可能产生的损失及误差, 并结合面积归一化法, 计算得到各脂肪酸甲酯在总检出脂肪酸甲酯中的相对含量。所有样品进行 3 次平行实验, 采用 SPSS 27 进行显著性差异统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 C4~C24 脂肪酸甲酯混合标准样品的组分信息

C4~C24 脂肪酸甲酯混合标准样品的总离子流图(TIC)示于图 1。除少数物理化学性质、碎片离子相似的脂肪酸(如 C18:3 ω -6、C18:1 ω -12 和 C18:1 ω -9)外, 大部分脂肪酸可实现基线分离。图中各色谱峰对应的 44 种脂肪酸涵盖了不同学科研究中的常见脂肪酸, 如肠道菌群代谢产物丁酸(C4:0)、疾病标志物棕榈酸(C16:0)、神经酸(*c*-C24:1 ω -9)、营养与生态标志物 DHA(C22:6 ω -3)/EPA(C20:5 ω -3)等。

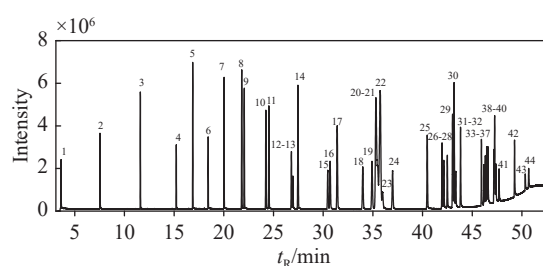


图 1 C4~C24 脂肪酸甲酯混合标准样品的 TIC 图
Fig. 1 TIC of C4-C24 fatty acid methyl ester mixed standard samples


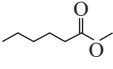
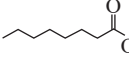
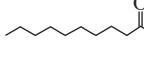
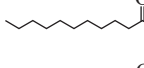
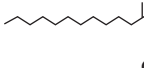
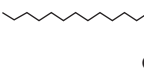
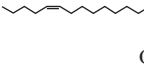
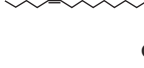

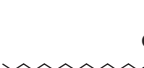
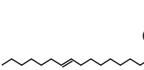
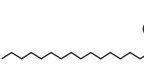
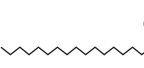
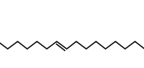
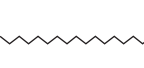
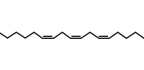
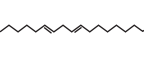
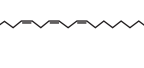
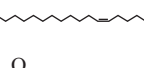


借助 MassHunter 定性软件以及 NIST 20.L 数据库对各组分色谱峰进行逐一识别, 各峰对应的物质名称、分子式、CAS 号以及出峰顺序列于表 1。总结脂肪酸甲酯的色谱出峰规律为: 按碳数由小到大出峰; 碳数相同时, 按不饱和度由小到大出峰; 不饱和度(双键数目)相同的异构体, 按双键所在位置数值由小到大出峰, 多双键结构按位置数值之和由小到大出峰; 碳数、双键数目和位置均相同时, 反式异构体先出峰, 顺式异构体后出峰。

2.2 粗脂肪含量测定

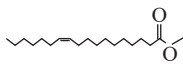
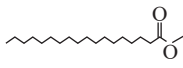
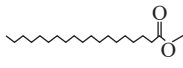
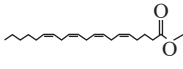
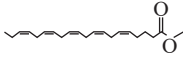
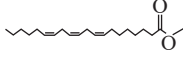
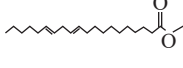
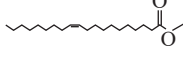
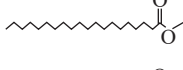
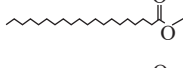
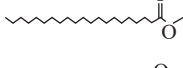
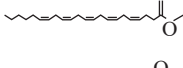
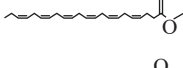
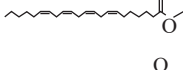
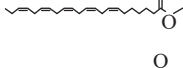
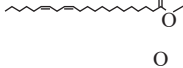
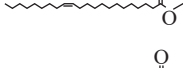
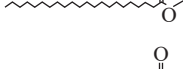
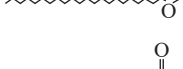
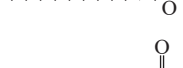
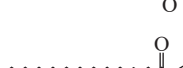
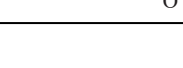
粗脂肪是指溶剂从样品中提取的脂溶性物质的总和, 包括甘油酯、游离脂肪酸和脂溶性非皂化物。本实验对比了正己烷/异丙醇、氯仿/甲醇和 MTBE/甲醇 3 种二元提取体系的粗脂肪提取效果, 结果示于图 2。可见, 不同二元提取条件下粗脂肪含量存在极显著差异($p < 0.01$)。其中, 氯仿/甲醇体系的脂肪提取效率最高, MTBE/甲醇体系次之, 而正己烷/异丙醇体系仅在体积比为 2:1 时, 粗脂肪含量才超过 100 mg/g。

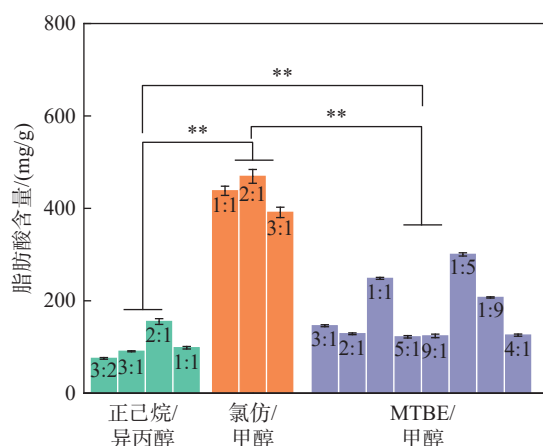
表1 C4~C24 脂肪酸甲酯混合标准样品的组分信息

Table 1 Component information of C4-C24 fatty acid methyl ester mixed standard samples

序号 No.	简称 Abbreviation	名称 Name	分子式 Formula	CAS号 CAS Number	保留时间 Retention time/min	结构式 Structure
1	C4:0	丁酸甲酯	C ₅ H ₁₀ O ₂	623-42-7	3.542	
2	C6:0	己酸甲酯	C ₇ H ₁₄ O ₂	106-70-7	7.496	
3	C8:0	辛酸甲酯	C ₉ H ₁₈ O ₂	111-11-5	11.575	
4	C10:0	癸酸甲酯	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	110-42-9	15.194	
5	C11:0	十一酸甲酯	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1731-86-8	16.844	
6	C12:0	月桂酸甲酯	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	111-82-0	18.410	
7	C13:0	十三酸甲酯	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	1731-88-0	19.997	
8	C14:1 ω -5	肉豆蔻烯酸甲酯	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	56219-06-8	21.775	
9	C14:0	肉豆蔻酸甲酯	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	124-10-7	22.030	
10	C15:1 ω -5	10-十五烯酸甲酯	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	90176-52-6	24.203	
11	C15:0	十五烷酸甲酯	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	7132-64-1	24.495	
12	<i>c</i> -C16:1 ω -7	棕榈油酸甲酯	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	1120-25-8	26.779	
13	<i>t</i> -C16:1 ω -7	反-棕榈油酸甲酯	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	10030-74-7	26.937	
14	C16:0	棕榈酸甲酯	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	112-39-0	27.420	
15	<i>c</i> -C17:1 ω -7	顺-10十七碳烯酸甲酯	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	77745-60-9	30.432	
16	<i>t</i> -C17:1 ω -7	反-10十七碳烯酸甲酯	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	369657-02-3	30.670	
17	C17:0	十七烷酸甲酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1731-92-6	31.354	
18	C18:3 ω -6	Γ -6,9,12-十八碳三烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	16326-32-2	33.947	
19	C18:2 ω -6	亚油酸甲酯	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	2566-97-4	34.873	
20	C18:3 ω -3	9,12,15-十八烷三烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	301-00-8	35.255	
21	<i>c</i> -C18:1 ω -12	6-十八烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	2777-58-4	35.372	
22	<i>c</i> -C18:1 ω -9	9-十八烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	112-62-9	35.906	

续表

序号 No.	简称 Abbreviation	名称 Name	分子式 Formula	CAS号 CAS Number	保留时间 Retention time/min	结构式 Structure
23	<i>c</i> -C18:1 ω -7	11-十八烯酸甲酯	C ₁₉ H ₃₆ O ₂	1937-63-9	36.037	
24	C18:0	硬脂酸甲酯	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	112-61-8	36.932	
25	<i>t</i> -C19:1 ω -9	反-10-十九烯酸甲酯	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	56599-83-8	40.437	
26	C20:4 ω -6	花生四烯酸甲酯	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	2566-89-4	41.940	
27	C20:5 ω -3	二十碳五烯酸甲酯	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	2734-47-6	42.111	
28	<i>c</i> -C20:3 ω -6	顺-8,11,14-二十碳三烯酸甲酯	C ₂₁ H ₃₆ O ₂	21061-10-9	42.463	
29	<i>c</i> -C20:2 ω -6	11,14-二十碳二烯酸甲酯	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	2463-02-7	42.983	
30	<i>c</i> -C20:1 ω -9	顺-11-二十烯酸甲酯	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	2390-09-2	43.134	
31	<i>t</i> -C20:1 ω -9	反-11-二十烯酸甲酯	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	3946-08-5	43.328	
32	C20:0	二十酸甲酯	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	1120-28-1	43.794	
33	C21:0	11,14-二十碳二烯酸甲酯	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	6064-90-0	45.901	
34	C22:5 ω -6	全顺-4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸甲酯	C ₂₃ H ₃₆ O ₂	31930-67-3	46.173	
35	C22:6 ω -3	DHA 甲酯	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	2566-90-7	46.297	
36	<i>c</i> -C22:4 ω -6	顺-7,10,13,16-二十二碳四烯酸甲酯	C ₂₃ H ₃₈ O ₂	13487-42-8	46.431	
37	C22:5 ω -3	二十二碳五烯酸甲酯	C ₂₃ H ₃₆ O ₂	108698-02-8	46.562	
38	<i>c</i> -C22:2 ω -6	顺-13,16-二十二烯酸甲酯	C ₂₃ H ₄₂ O ₂	61012-47-3	47.159	
39	<i>c</i> -C22:1 ω -9	芥油酸甲酯	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	1120-34-9	47.303	
40	<i>t</i> -C22:1 ω -9	反芥油酸甲酯	C ₂₃ H ₄₄ O ₂	56630-69-4	47.364	
41	C22:0	二十二酸甲酯	C ₂₃ H ₄₆ O ₂	929-77-1	47.675	
42	C23:0	二十三烷酸甲酯	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	2433-97-8	49.272	
43	<i>c</i> -C24:1 n -9	顺-15-二十四烯酸甲酯	C ₂₅ H ₄₈ O ₂	2733-88-2	50.335	
44	C24:0	二十四烷酸甲酯	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	2442-49-1	50.691	



注: 图中所示比例均为溶剂体积比(V/V); **表示在不同二元提取条件下粗脂肪含量存在极显著差异($p < 0.01$)

图2 二元提取体系的粗脂肪含量对比

Fig. 2 Comparison of lipid content in binary extraction systems

在这3种二元提取体系的前处理过程中,有机相分别位于氯仿相(下层)、正己烷相(下层)和MTBE相(上层)。在前2种体系中,转移有机相的过程中不可避免地掺杂了少量蛋白沉淀及不溶物(气溶胶污染),这不仅会造成样品损失,还会影响分析方法的准确性和精确度。相比之下,MTBE的密度较小,提取的含脂质有机相在分离过程中形成于上层,从而减少了液滴损失,更有利于脂质的收集。

2.3 二元溶剂体系提取效果对比

对于同一组织样品,不同混合溶剂及溶剂比

例提取的脂肪酸种类和相对含量有所不同。基于面积归一化计算得到的各样品脂肪酸相对含量堆积图示于图3。可知,正己烷/异丙醇、氯仿/甲醇和MTBE/甲醇这3种二元提取剂均能从瓜头鲸肝脏组织中提取出C14:0、*c*-C16:1 ω -7、*t*-C16:1 ω -7、C16:0、*c*-C18:1 ω -12、*c*-C18:1 ω -9、C18:0、C20:4 ω -6脂肪酸。对于氯仿/甲醇二元体系,虽然甲醇比例较高,从细胞膜和脂质蛋白中分解脂质的能力较强,粗脂肪提取效率最高,但该溶剂可提取的非极性脂质种类较少。值得注意的是,当氯仿/甲醇体积比为1:1时,该溶剂体系可提取少量C12:0、C13:0、C14:1 ω -5和C15:0脂肪酸。正己烷/异丙醇体系的脂肪酸提取效果介于氯仿/甲醇体系和MTBE/甲醇体系之间,当体积比为2:1时,可提取的脂肪酸种类最多,脂肪酸组成接近氯仿/甲醇体系,该提取剂毒性低,可作为含疑似致癌物的氯仿,以及具有视神经损害的甲醇替代试剂。相较于这2个体系,MTBE/甲醇体系从瓜头鲸肝脏组织样品中提取的脂肪酸种类更多。当MTBE/甲醇体积比在1:1~9:1时,可提取出*c*-C20:2 ω -6、*c*-C20:1 ω -9、C22:6 ω -3、C22:5 ω -3、*c*-C22:2 ω -6脂肪酸;而当提取剂中甲醇比例占优势时,可提取的脂肪酸种类减少,这可能与提取剂中非极性溶剂占比不足,导致脂质中非极性组分溶解度下降有关;当MTBE/甲醇体积比为5:1时,提取的脂肪酸种类

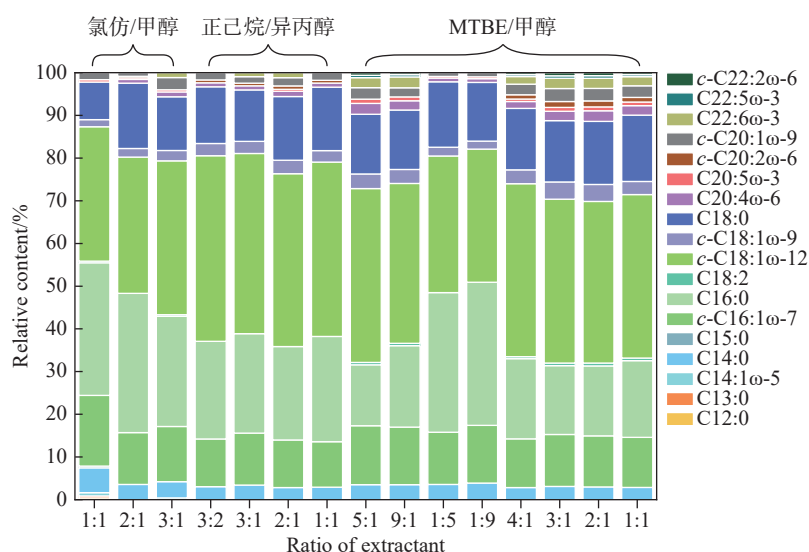


图3 氯仿/甲醇、正己烷/异丙醇、MTBE/甲醇二元体系提取的脂肪酸相对含量堆积图

Fig. 3 Stacked chart of the relative contents of fatty acids extracted by chloroform/methanol, *n*-hexane/isopropanol, MTBE/ methanol binary systems

最多,且整体相对含量较高。

总体而言,MTBE/甲醇溶剂能够从瓜头鲸肝脏样品中提取更全面且多样化的脂肪酸,其中包括 ω -3系脂肪酸;若需提取低碳数脂肪酸,优先选用氯仿/甲醇(1:1, *V/V*)溶剂;正己烷/异丙醇的毒性最低,但提取效果相对较差。

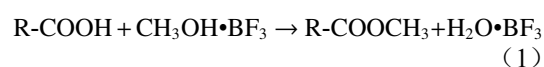
由于氯仿/甲醇和MTBE/甲醇体系可提取到部分不重合的脂肪酸组分,因此本实验设计了MTBE/氯仿/甲醇三元体系,以探索提取更多种类脂肪酸的可行性,示于图4。从图4中第1~5组实验结果可知,当保持MTBE/甲醇体积比为5:1的最优比例,向提取溶剂中添加少量氯仿,即MTBE/氯仿/甲醇(5:0.5:1~5:2:1)体系时,组分中脂肪酸种类与MTBE/甲醇二元体系提取结果一致。随着氯仿占比的增大,C22:5 ω -3和*c*-C22:2 ω -6脂肪酸含量减少甚至无法检出,这是由于氯仿极性大于MTBE,混合溶剂极性增强会导致其对长链脂肪酸的溶解能力下降。但若增加甲醇用量(第6组实验),即MTBE/氯仿/甲醇(5:1:2)时,强极性的甲醇提高了混合溶剂分解脂质的能力,因此可提取的C22:5 ω -3和*c*-C22:2 ω -6脂肪酸含量增加并达到检出限。第7、8组实验在保证MTBE/甲醇(5:1)和氯仿/甲醇(1:1)最优比例的基础上,继续增加氯仿占比,对比混合溶剂总体积变化对提取效果的影响。其中,实验组5:3:4(1)的总体积是5:3:4(2)的2倍,这2组实验仅提取到3~4种脂肪酸,与实验过程中转移得到的有机相清液颜色明显浅于前5组的实验现象相吻合,表明该比例混合溶剂溶解脂质的能力较差,且增大体积也无法改善,因此不适用

于提取脂质。第8~11组实验结果表明,以氯仿/甲醇(1:1)为主,加入MTBE的提取效果与MTBE/甲醇二元体系相当,改变氯仿占比对提取效果影响甚微。这可能是由于加入少量极性更弱的MTBE后,更容易溶解脂质中的非极性脂肪酸,且更易进入样品分离后的有机层。

综上所述,加入氯仿形成三元提取体系并未提取出更多种类的脂肪酸。因此,最佳的提取剂为MTBE/甲醇(5:1)二元体系。

2.4 衍生试剂浓度对脂肪酸含量的影响

由于脂肪酸沸点较高,且高温下不稳定易裂解,因此,在提取脂肪酸后,需先将其与含三氟化硼催化剂(BF_3)的甲醇溶液进行衍生反应,形成沸点较低、稳定性较高的脂肪酸甲酯,再进行后续分析^[29]。衍生反应原理示于式(1)。路易斯酸 BF_3 可与甲醇形成配位化合物,使甲醇分子中的氧原子带正电;亲核性增强后的甲醇与脂肪酸的羧基反应,生成脂肪酸甲酯和水; BF_3 与反应生成的水结合形成稳定络合物,从而推动反应向酯化方向进行,起到良好的催化作用。



在大多数脂肪酸甲酯化衍生实验中,衍生过程通常采用质量浓度为14%的 BF_3 -MeOH溶液。本实验通过改变衍生试剂 BF_3 -MeOH浓度,得到的脂肪酸含量对比结果示于图5。可见,当衍生试剂浓度在5%~14%范围时,各脂肪酸含量几乎保持一致,这表明浓度5%试剂的衍生效果与14%相当。从绿色化学原则的角度出发,应选择更低浓度的 BF_3 -MeOH溶液。

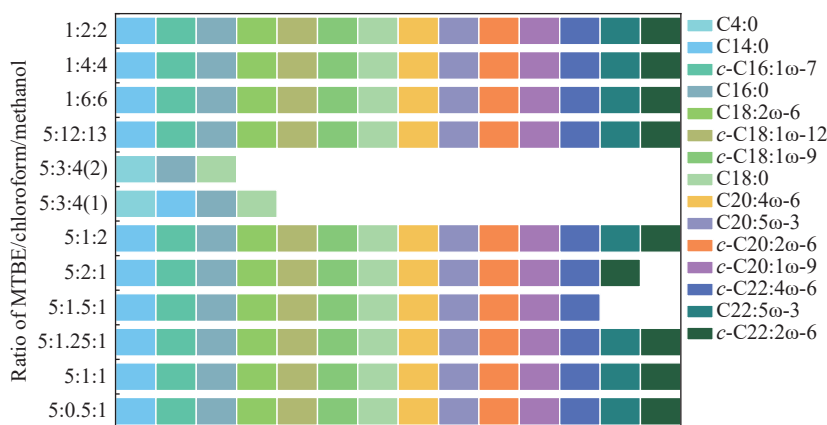
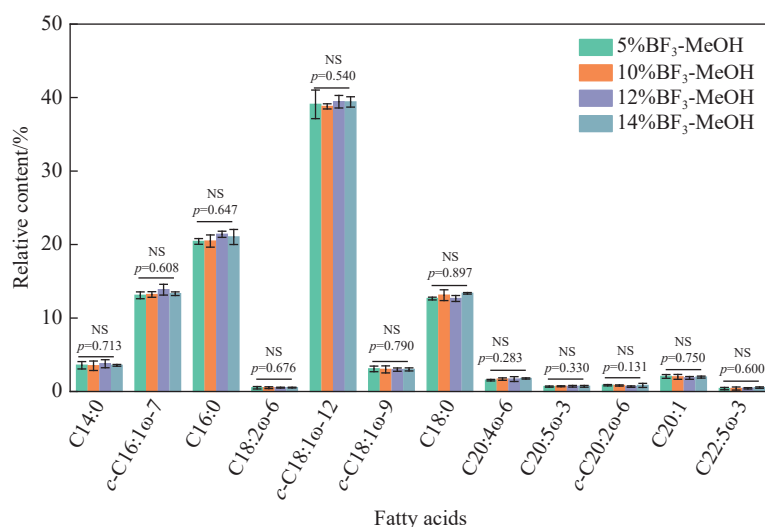


图4 MTBE/氯仿/甲醇三元体系提取的脂肪酸组成对比图

Fig. 4 Comparison of fatty acid composition in MTBE/chloroform/methanol ternary system



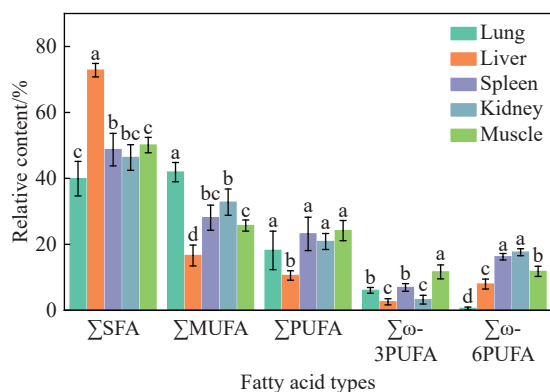
注: NS 表示不同浓度衍生试剂条件下, 各脂肪酸含量的差异未达到统计学显著水平 ($p > 0.05$)

图 5 不同三氟化硼-甲醇衍生试剂浓度下的脂肪酸含量对比图

Fig. 5 Comparison of fatty acid contents at different concentrations of boron trifluoride-methanol derivatization reagent

2.5 不同组织的脂肪酸组成

采用 MTBE/甲醇(5:1)溶剂对瓜头鲸的肝脏、肺、脾、肾、肌肉组织的脂质进行提取分析, 结果示于图 6。可见, 不同组织的脂肪酸组成呈现显著差异特征: 肝脏中不饱和脂肪酸在总脂中占比达 60.09%, 如肉豆蔻烯酸、花生四烯酸和 DHA(结构示于图 7), 饱和脂肪酸仅占 39.91%。



注: Σ SFA 为碳链中无双键的直链脂肪酸总和; Σ MUFA 为碳链中含 1 个双键的脂肪酸总和; Σ PUFA 为碳链中含 ≥ 2 个双键的脂肪酸总和; $\Sigma\omega$ -3PUFA 为首个双键位于甲基端第 3~4 碳间 (ω -3 位) 的 PUFA 总和; $\Sigma\omega$ -6PUFA 为首个双键位于甲基端第 6~7 碳间 (ω -6 位) 的 PUFA 总和; 不同小写字母 a~d 表示数据间存在统计学差异 ($p < 0.05$)

图 6 MTBE/甲醇体系提取瓜头鲸样品的肝脏、肺、脾、肾、肌肉中脂肪酸组成

Fig. 6 Fatty acid compositions in liver, lung, spleen, kidney and muscle of melon-headed whale samples extracted by MTBE/methanol system

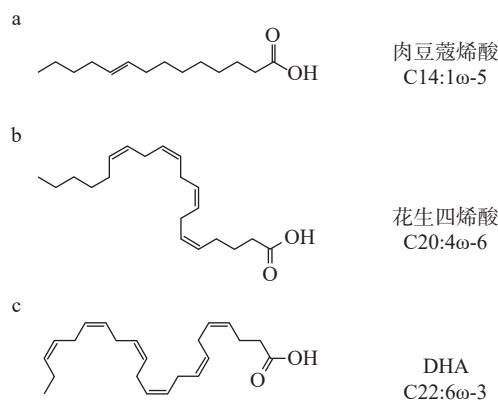


图 7 瓜头鲸肝脏中典型的不饱和脂肪酸结构示意图

Fig. 7 Schematic diagram of typical unsaturated fatty acids structures in the liver of melon-headed whale

作为脂质代谢的核心器官, 肝脏不仅富含多不饱和脂肪酸, 还承担脂肪的合成与释放、脂肪酸 β 氧化等关键代谢功能。这种复杂的代谢网络使其对代谢失衡具有高度敏感性, 当遭遇环境污染胁迫时, 肝脏往往最先出现脂质代谢异常, 这也解释了其在环境毒理学中具有特殊性指示价值的内在机制。肺部的脂肪酸组成趋势与之相反, 其饱和脂肪酸占比达 72.82%, 这是因为肺部肺泡表面覆盖的表面活性物质需要由大量直链结构的饱和脂肪酸来合成, 其紧密的疏水分子排列有助于增强机械稳定性、降低肺泡表

面张力, 从而防止呼气时肺泡塌陷。脾和肾脏的脂肪酸组成相似, 主要源于这 2 种器官组织在血液处理、氧化应激应对、代谢途径共享及污染物响应上的功能重叠。肌肉中富含 50.11% 饱和脂肪酸(如棕榈酸, C16:0), 有利于能量储存。综上, 不同类型脂肪酸在各组织间的分布存在显著性差异($p < 0.05$), 这是由各组织脂肪酸合成能力不同以及参与的生理代谢过程不同所导致的^[30-32]。

3 结论

本研究基于 GC-Q-TOF MS 定性技术, 建立了瓜头鲸肝脏、肺、脾、肾和肌肉组织中脂肪酸的测定方法, 并结合 NIST20 谱库以及相关文献, 比较了 3 种二元溶剂体系(氯仿/甲醇、正己烷/异丙醇、MTBE/甲醇)对瓜头鲸肝脏脂肪酸的提取效果。结果表明, MTBE/甲醇(5:1)体系不仅可富集最多的脂肪酸(包括特征性 ω -3 类脂肪酸), 且兼具低毒性、高操作安全性(有效避免气溶胶污染)及样品完整性等优点。相比之下, 氯仿/甲醇体系虽因强极性表现出更高的总脂提取效率, 但操作过程中易造成低分子质量脂肪酸的损失, 仅在特定体积比(1:1)下可检出少量短链脂肪酸; 而三元溶剂体系(MTBE/氯仿/甲醇)提取的脂肪酸与 MTBE/甲醇体系无明显差异, 额外添加氯仿未能提升方法的性能。在衍生化工工艺优化中, 将三氟化硼-甲醇溶液浓度降至 5% 仍可保持与原浓度(常规 14%)相当的衍生效率, 降低了实验过程中的毒性暴露风险, 符合绿色化学的可持续发展理念。

此外, 本研究将优化后的提取-衍生方法拓展至鲸类动物多组织(肝脏、肺、脾、肾及肌肉)分析, 系统揭示了鲸类动物不同器官脂肪酸组成与其生理功能的适配性规律, 同时为鲸类动物脂质组学研究提供了高效、通用的提取方法, 对评估污染物胁迫下生物标志物的早期响应具有重要价值。

致谢: 感谢中国科学院深海科学与工程研究所海洋哺乳动物与海洋生物声学研究室张培君研究员等提供样品。

参考文献:

[1] WISHART D S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine[J]. *Nature*

Reviews Drug Discovery, 2016, 15(7): 473-484.

- [2] ATHERSUCH T J. The role of metabolomics in characterizing the human exposome[J]. *Bioanalysis*, 2012, 4(18): 2 207-2 212.
- [3] REBRYK A, HAGLUND P. Non-targeted screening workflows for gas chromatography-high-resolution mass spectrometry analysis and identification of biomagnifying contaminants in biota samples[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2021, 413(2): 479-501.
- [4] HOU R, XU Y, WANG Z. Review of OPFRs in animals and humans: absorption, bioaccumulation, metabolism, and internal exposure research[J]. *Chemosphere*, 2016, 153: 78-90.
- [5] 解怀君, 闫振辉, 田甲申, 杜静, 刘昱宏. 海洋哺乳动物体内新污染物生理毒代动力学模型研究进展[J]. *海洋环境科学*, 2024, 43(4): 514-523.
XIE Huaijun, YAN Zhenhui, TIAN Jiashen, DU Jing, LIU Yuhong. Research progress of physiologically based toxicokinetic model for emerging pollutants in marine mammals[J]. *Marine Environmental Science*, 2024, 43(4): 514-523(in Chinese).
- [6] DANNENBERGER D, MÖLLER R, WESTPHAL L, MORITZ T, DÄHNE M, GRUNOW B. Fatty acid composition in blubber, liver, and muscle of marine mammals in the southern Baltic Sea[J]. *Animals*, 2020, 10(9): 1 509.
- [7] RUIZ-HERNÁNDEZ I M, NOURI M Z, KOZUCH M, DENSLON N D, DÍAZ-GAMBOA R E, RODRÍGUEZ-CANUL R, COLLÍ-DULÁ R C. Trace element and lipidomic analysis of bottlenose dolphin blubber from the Yucatan coast: lipid composition relationships[J]. *Chemosphere*, 2022, 299: 134 353.
- [8] PAN Y, LUO Z, ZHUO M, WEI C, CHEN G, SONG Y. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction mediated Cd-induced hepatic lipid accumulation in zebrafish *Danio rerio*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 199: 12-20.
- [9] 许强, 杨红生. 脂肪酸标志物在海洋生态系统营养关系研究中的应用[J]. *海洋学报*, 2011, 33(1): 1-6.
XU Qiang, YANG Hongsheng. Fatty acid biomarker and its application in marine trophic relation studies[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2011, 33(1): 1-6(in Chinese).
- [10] ABEDI E, ALI SAHARI M. Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties[J]. *Food Science & Nutrition*, 2014, 2(5): 443-463.
- [11] SILVA C O, SIMÕES T, NOVAIS S C, PIMPAREL I, GRANADA L, SOARES A M V M, BARATA C, LEMOS M F L. Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution[J]. *Science of The Total Environment*, 2017, 586:

- 542-550.
- [12] JOVIČIĆ K, DJIKANOVIĆ V, SANTRAC I, ŽIVKOVIĆ S, DIMITRIJEVIĆ M, VRANKOVIĆ J S. Effects of trace elements on the fatty acid composition in Danubian fish species[J]. *Animals*, 2024, 14(6): 954.
- [13] MOHY EL-DIN S M. Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine *Pterocladia capillacea*, *Sargassum hornschurchii* and *Ulva lactuca*[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2018, 15(4): 791-800.
- [14] 董诗婷, 陈弘培, 赵慧, 陈珍金, 刘斌, 曾峰. 海洋生物功能性脂类的研究进展[J]. *农产品加工*, 2017(13): 59-64.
DONG Shiting, CHEN Hongpei, ZHAO Hui, CHEN Zhenjin, LIU Bin, ZENG Feng. The research progress of marine functional lipids[J]. *Farm Products Processing*, 2017(13): 59-64(in Chinese).
- [15] 任崇兰, 张俊波, 尹方, 朱文斌, 刘家林, 万荣. 浙江南部近海海洋生物脂肪酸含量及组成分析[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(4): 470-481.
REN Chonglan, ZHANG Junbo, YIN Fang, ZHU Wenbin, LIU Jialin, WAN Rong. Fatty acid contents and composition of marine species from the offshore waters of southern Zhejiang, East China Sea[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(4): 470-481(in Chinese).
- [16] 王允茹, 蔡秋杏, 张晨晓, 董庆亮, 牛改改, 石宇, 覃凤青. 北部湾海区几种常见牡蛎基础营养及脂肪酸成分比较分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(7): 2 849-2 854.
WANG Yunru, CAI Qiuxing, ZHANG Chenxiao, DONG Qingliang, NIU Gaigai, SHI Yu, QIN Fengqing. Comparative analysis of basic nutrition and fatty acid composition of several common oysters in Beibugulf[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(7): 2 849-2 854(in Chinese).
- [17] 周康利. 裂壶藻活体细胞与其藻粉对凡纳滨对虾幼体生长影响的比较研究[D]. 广州: 暨南大学, 2022.
- [18] BOSSART G D. Marine mammals as sentinel species for oceans and human health[J]. *Vet Pathol*, 2011, 48(3): 676-690.
- [19] AGUILAR A, BORRELL A, PASTOR T. Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans[J]. *J Cetacean Res Manage*, 1999: 83-116.
- [20] 宋诗瑶, 白玉, 刘虎威. 脂质组学分析中样品前处理技术的研究进展[J]. *色谱*, 2020, 38(1): 66-73.
SONG Shiyao, BAI Yu, LIU Huwei. Advances in the development of the sample preparation techniques in lipidomics[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020, 38(1): 66-73(in Chinese).
- [21] SAINI R K, PRASAD P, SHANG X, KEUM Y S. Advances in lipid extraction methods-a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(24): 13 643.
- [22] BREIL C, ABERT VIAN M, ZEMB T, KUNZ W, CHEMAT F. “Bligh and dyer” and folch methods for solid-liquid-liquid extraction of lipids from microorganisms. comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(4): 708.
- [23] FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1957, 226(1): 497-509.
- [24] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1959, 37(8): 911-917.
- [25] HARA A, RADIN N S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent[J]. *Analytical Biochemistry*, 1978, 90(1): 420-426.
- [26] MATYASH V, LIEBISCH G, KURZCHALIA T V, SHEVCHENKO A, SCHWUDKE D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics[J]. *Journal of Lipid Research*, 2008, 49(5): 1 137-1 146.
- [27] LÖFGREN L, FORSBERG G B, STÅHLMAN M. The BUMÉ method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 27 688.
- [28] 周力, 王松松, 李莉, 孙源. 正丙醇/正己烷/水三组分体系萃取小球藻中的脂质[J]. *南昌大学学报(理科版)*, 2013, 37(1): 55-58.
ZHOU Li, WANG Songsong, LI Li, SUN Yuan. n-Propanol/hexane/water three-component system to extract lipid from *Chlorella sp*[J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2013, 37(1): 55-58(in Chinese).
- [29] METCALFE L D, SCHMITZ A A, PELKA J R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 1966, 38(3): 514-515.
- [30] LU X, LI G, LIU Y, LUO G, DING S, ZHANG T, LI N, GENG Q. The role of fatty acid metabolism in acute lung injury: a special focus on immunometabolism[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2024, 81(1): 120.
- [31] 战丽彬. 脾虚与物质能量代谢[J]. *大连医科大学学报*, 2014, 36(1): 1-6.
ZHAN Libin. Spleen deficiency syndrome and substance and energy metabolism[J]. *Journal of Dalian Medical University*, 2014, 36(1): 1-6(in Chinese).
- [32] HODSON L, GUNN P J. The regulation of hepatic fatty acid synthesis and partitioning: the effect of nutritional state[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2019, 15(12): 689-700.

(收稿日期: 2025-04-30; 修回日期: 2025-07-10)